

Deteksi Penyakit TSV (*Taura Syndrome Virus*) secara PCR pada Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*) dengan Berbagai Ekstraksi, Suhu dan Waktu Penyimpanan

Detection of TSV (Taura Syndrome Virus) Disease on Vannamei Shrimp (Litopenaeus vannamei) with Variety of Extraction, Temperature and Storage Time by PCR

O. Surfianti, N.C. Prihartini, M. Fathoni, E.R. Ekoputri, Laminem, R. Wilis ,
E. Pujiastuti , Sokhib dan A.D. Koswara

Balai Karantina Ikan Kelas I Juanda, Kementerian Kelautan dan Perikanan, Surabaya

Abstract

The shrimp farming industries have been adversely affected by epizootics due to viral pathogens, especially Taura Syndrome Virus (TSV). The TSV has been the causative agent of economically disastrous epizootics in Penaeus vannamei, causing mass mortalities of 40% – 90% in affected post larval and juvenile population. The current diagnostic and detection methods for TSV included clinical signs, gross pathology, in situ hybridization, and PCR. Three RNA extraction methods, i.e. RNA lysis buffer with Guanidine – HCL, RNA lysis buffer with beta-mercaptoethanol dan phenol – chloroform) were used to evaluate the vannamei shrimp infected with TSV. The study showed that RNA extracted using the RNA lysis buffer with beta-mercaptoethanol, constantly had the highest yield as measured (quality and quantity) using a geneQuant spectrophotometer at period of 3 month in -20°C storage, except the one extracted by phenol – chloroform extraction had the highest yield quantity at -80°C. Each of 3 (three) extraction methods yielded sufficient RNA for positive results in a RT PCR for TSV at period of 1 month, and 2 months, in both temperature storage (-20°C and -80°C), but at period of 3 months, only the phenol - chloroform extraction give positive result after it was stored at -20°C and -80°C.

Keywords : Vannamei shrimp, Taura Syndrome Virus, PCR

Pendahuluan

Budidaya udang merupakan salah satu kegiatan perikanan yang sampai saat ini memiliki peluang yang sangat prospektif ditinjau dari kesempatan untuk pengiriman pada skala internasional dan harganya yang tinggi sehingga sangat menguntungkan bagi para pelaku usaha. Dalam usaha memacu produksi udang nasional yang selama beberapa tahun terakhir terus menurun, maka pemerintah secara resmi memperkenalkan udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*) dan udang rostris (*L. stylostris*) ke Indonesia (Anonymous, 2004).

Sampai saat ini belum didapatkan cara yang efektif untuk menanggulangi serangan virus. Satu-satunya cara yang dapat dilakukan adalah dengan pencegahan dan deteksi dini. Menurut

Lightner (1996) dalam Lightner *et al.* (1998), diagnosa TSV dapat dilakukan berdasarkan gejala klinis, gross patologi, *in situ hybridisasi*, *bioassay*, atau uji yang paling cepat adalah PCR. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan metode yang akurat untuk mendeteksi adanya virus yang menyerang organisme budidaya (Anonymous, 2004).

PCR termasuk metode deteksi penyakit secara molekuler yang efektif dan efisien, yaitu dengan cara memperbanyak fragmen DNA spesifik tanpa bantuan sel bakteri. Teknik ini merupakan teknik enzimatik secara *invitro* untuk memperbanyak fragmen DNA dengan memperpanjang primer secara simultan pada strand DNA yang teramplifikasi sekitar 2 kali lebih banyak dari setiap siklus (Koesharyani *et. Al.*, 2001).

Pemeriksaan dengan metode PCR terdiri dari tiga tahapan. Proses ini bermula dari ekstraksi DNA/RNA sampel untuk penyediaan cetakan, amplifikasi DNA/RNA dengan bantuan mesin PCR (*thermocycler*) dan analisa hasil amplifikasi dengan elektroforesis, pewarnaan DNA/RNA dan dokumentasi dengan kamera polaroid.

Ekstraksi merupakan tahap awal dalam proses pemisahan DNA/RNA dan merupakan tahapan penting untuk tahap uji berikutnya, sehingga harus bebas dari kontaminasi. Ekstraksi dapat dilakukan dengan berbagai cara, dan saat ini ekstraksi DNA/RNA mudah dikerjakan dengan menggunakan berbagai jenis metode ekstraksi DNA/RNA yang telah tersedia di pasaran. Berkaitan dengan hal tersebut diatas, maka tujuan studi ini adalah untuk mendapatkan data atau gambaran mengenai jenis ekstraksi yang terbaik dari beberapa jenis ekstraksi, suhu dan waktu penyimpanannya.

Bahan dan Metode

Sampel Percobaan

Sampel Uji adalah udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*) yang merupakan udang inang dari TSV (*Taura Sindrome Virus*) yang diambil dari sentra budidaya vannamei, yaitu Situbondo, Jawa Timur. Udang sampel diambil dalam kondisi hidup, dan kemudian dilakukan uji pendahuluan.

Ekstraksi

Ekstraksi merupakan tahapan awal dalam proses PCR guna mendapatkan genom RNA dengan bahan yang digunakan dalam proses ekstraksi pada metode ekstraksi *RNA lysis buffer with guanidine-HCL* (Metode Ekstraksi I), *RNA lysis buffer with Beta-Mercaptoethanol* (Metode Ekstraksi II) dan *phenol-chloroform* (Metode Ekstraksi III).

Sedangkan suhu dan waktu penyimpanan hasil ekstraksi dilakukan dengan waktu penyimpanan 1 bulan, 2 bulan dan 3 bulan pada suhu -20°C dan -80°C .

Amplifikasi

Teknik amplifikasi bekerja dalam siklus yang berulang-ulang sebanyak 20x - 30x. Setiap siklus terdiri atas 3 tahapan yaitu : *Denaturasi* (pemecahan DNA) pada suhu 94°C , *Annealing* (penempelan primer) pada suhu 56°C dan *Extension* (pemanjangan primer) pada suhu 74°C . Hasil sintesa DNA dalam satu siklus dapat berperan sebagai cetakan (*template*) pada siklus berikutnya, maka jumlah DNA target menjadi berlipat dua pada setiap akhir siklus. Bahan amplifikasi yang digunakan antara lain *Agarose gel (2% Gel-O-Shooter)*, *Akuades Steril*, *IQzyme DNA Polymerase*, *Nested PCR mix*, *RT-PCR Premix*, *RT Enzyme mix*, *TSV Primer Mix*.

Elektroforesis

Elektroforesis dengan gel agarose termasuk tehnik yang sederhana, mudah penanganannya, cepat dikerjakan, murah, dan memerlukan sampel yang relatif sedikit (1 μl DNA dapat dideteksi dalam gel). Bahan elektroforesis antara lain *Ethidium bromida*, *6x Loading dye*, *Marker*, *Molecular Weight Ladder*, *TAE buffer*.

Hasil dan Pembahasan

Pencarian Sampel

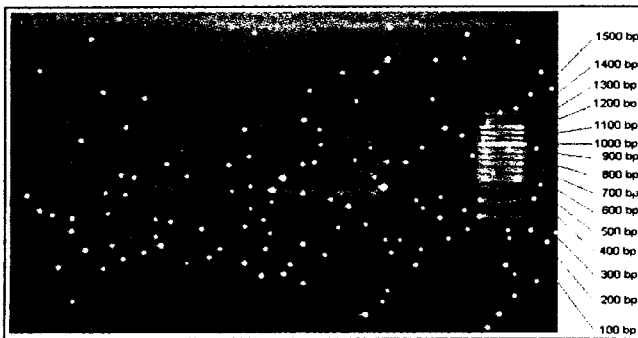
Udang sampel diambil dalam kondisi hidup, secara klinis sampel yang diambil digunakan dalam uji ini sudah menunjukkan gejala TSV, yaitu berenang ke pinggir, daging agak lunak, ekor kipas (telson) kemerahan, dan bercak hitam di bawah lapisan kutikula (Gambar 1).

Sampel yang secara klinis menunjukkan gejala terinfeksi TSV selanjutnya diuji dengan pemeriksaan PCR dan hasilnya adalah TSV positif seperti Gambar 2.

Sampel udang vannamei yang terdeteksi TSV positif langsung dilakukan isolasi virus untuk memperoleh virus TSV (Wyban, et al. 1992 dalam Lightner et al. 1998).



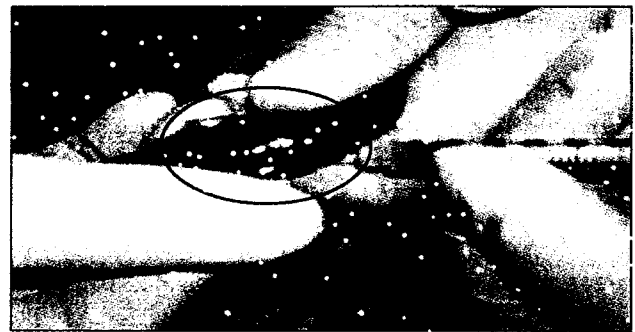
Gambar 1 . Gejala klinis TSV (ditunjukkan dengan lingkaran). Keterangan A : Kaki renang berwarna kemerahan; B: Telson berwarna kemerahan; C-D : Adanya bintik hitam (melanisasi) disekitar tubuh.



Gambar 2. Hasil elektroforesis uji PCR TSV Positif sampel dari Situbondo. Keterangan : 1. Marker DNA Lamda 100 bp – 1500; 2. Kontrol negatif (-); 3. Kontrol positif (284 bp, 476 bp, 848 bp); 4,6 dan 7 Sampe! positif 476 bp; 5 sampel negatif).

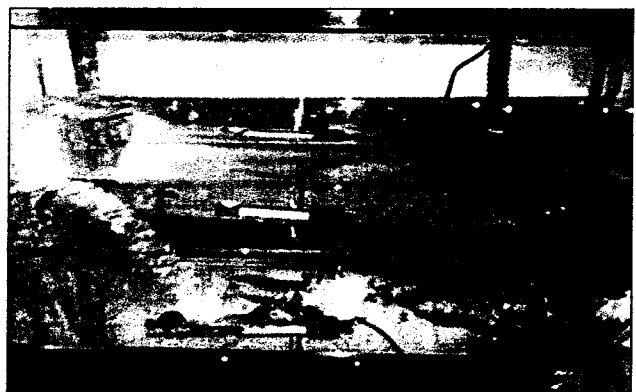
Hasil isolasi virus RNA TSV positif yang berupa supernatan dilarutkan kedalam 2% NaCl dengan perbandingan 1:10, kemudian sebanyak 0,1 ml/5gr berat badan udang vannamei diinfeksi melalui penyuntikan udang vannamei sebanyak 3 ekor dalam kondisi moulting. Lightner (1995), mengatakan bahwa udang pada kondisi moulting akan mengalami tingkat stress yang cukup tinggi dan akan sangat mudah terinfeksi oleh berbagai agen penyakit termasuk virus TSV.

Penyuntikan virus TSV dilakukan pada bagian dorsolateral yaitu diantara ruas ke 3 dan ke 4 abdominal sampai masuk 45 derajat kedalam otot daging seperti Gambar 3.



Gambar 3. Proses penyuntikan TSV pada udang Vannamei

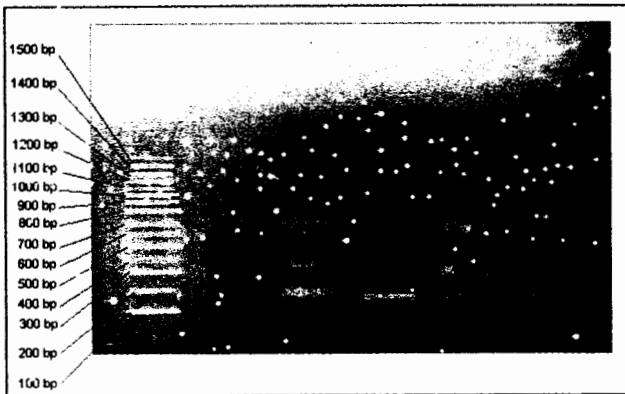
Sampel udang yang telah diinfeksi TSV kemudian ditampung dalam aquarium berukuran 40 x 25 x 30 cm dan dicampur dengan beberapa ekor udang vannamei sehat untuk perlakuan kohabitasi.



Gambar 4. Perlakuan kohabitasi udang Vannamei dalam aquarium menunjukkan perlakuan kohabitasi dengan heater

Hasil perlakuan kohabitasi pada udang selama beberapa hari memunculkan gejala klinis berupa warna kemerahan terutama pada ekor kipas (*telson*), kulit tubuh menjadi lunak dan perut kosong serta terdapat bercak hitam (*melanisasi*) di bawah lapisan kutikula.

Hasil infeksi TSV positif berat pasca infeksi dan kohabitasi seperti Gambar 5.



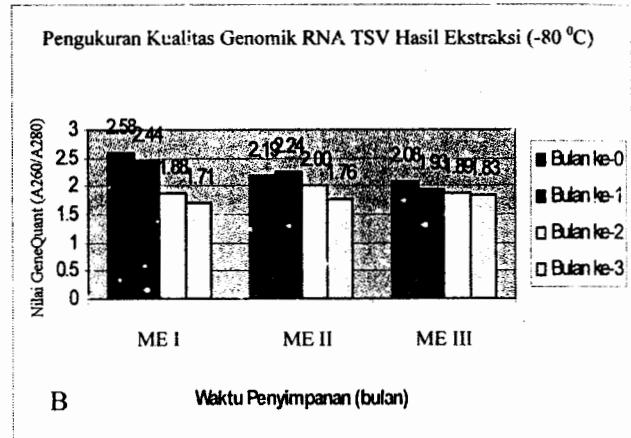
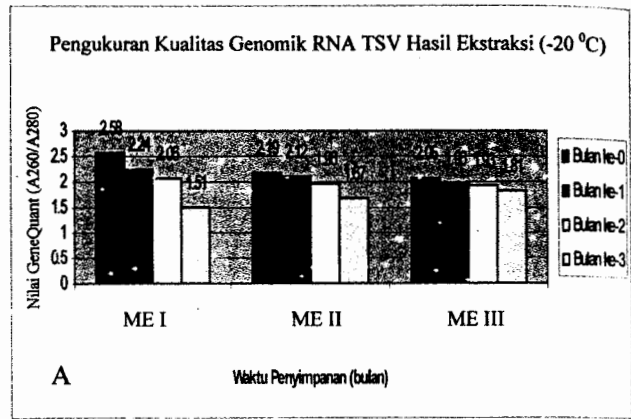
Gambar 5. Hasil elektroforesis uji PCR dari udang vannamei yang diinfeksi TSV. Keterangan : 1. Marker DNA Lamda 100 bp – 1500 bp; 2. Kontrol Negatif (-) ; 3. Kontrol TSV Positif Berat (284 bp, 476 bp dan >800 bp); 4. Kontrol TSV Positif Ringan (284 bp); 5. Sampel TSV Positif Berat (284 bp, 476 bp dan 848 bp); 6. Sampel TSV Positif Ringan (284 bp).

Perlakuan Suhu Penyimpanan -20°C dan -80°C

Pengamatan ini didasarkan atas pengukuran terhadap hasil pengukuran kualitas genomik dan kuantitas genomik RNA dari alat spektrofotometer. Hasil kuantifikasi RNA dilanjutkan dengan analisa regresi menggunakan program statistik ANOVA dengan rancangan acak kelompok faktorial.

Hasil Pengukuran Kualitas Genomik RNA TSV

Sambrook and Russel, 2003 mengatakan kualitas genomik RNA ditentukan oleh tingkat kontaminasi protein dalam larutan. Kualitas larutan dapat dilihat dengan membagi nilai A_{260} dengan A_{280} . Ratio hasil ekstrak RNA secara umum berkisar 1,8 - 2,0. Jika rasio < 1,8 menunjukkan bahwa preparasi RNA terkontaminasi oleh protein atau phenol dalam larutan.



Gambar 6. Grafik pengukuran genomik RNA TSV hasil ekstraksi pada penyimpanan suhu -20°C (A) dan grafik pengukuran genomik RNA TSV hasil ekstraksi pada penyimpanan suhu -80 °C (B) untuk bulan ke-0 hingga ke -3.

Berdasarkan Gambar 6 diatas menunjukkan bahwa ketiga jenis metode ekstraksi mengalami penurunan tingkat kualitas genomik RNA pada suhu -20°C dan -80 °C. Metode Ekstraksi III memiliki tingkat kualitas genomik RNA yang terbaik karena keseluruhan nilai kualitas genomik RNA yang dicapai berada dalam kisaran yang ditentukan dan penurunan tingkat kualitas genomik pada metode ekstraksi III relatif lebih stabil jika dibandingkan dengan kedua jenis metode ekstraksi lainnya.

Untuk mengetahui adakah pengaruh waktu penyimpanan 0, 1, 2 dan 3 bulan dengan suhu -20°C dan -80°C terhadap kemurnian RNA yang dihasilkan oleh ketiga metode ekstraksi maka dilakukan analisa regresi berdasarkan perhitungan dengan menggunakan program statistik ANOVA dengan rancangan acak kelompok faktorial.

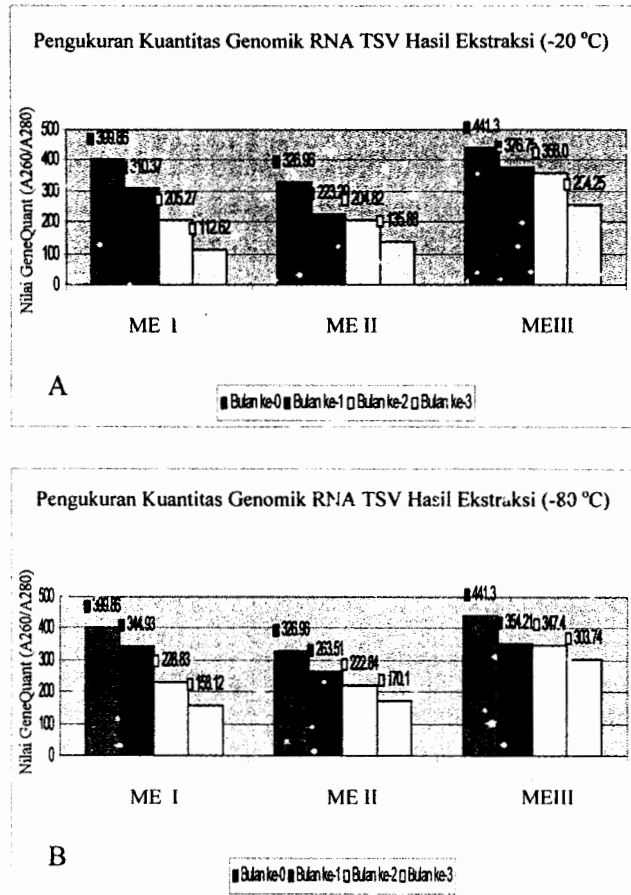
Analisa Regresi untuk Pengamatan Hasil Kualitas Genomik RNA pada Suhu Penyimpanan -20°C dan -80°C

Berdasarkan Grafik pada Gambar 6 diatas menunjukkan bahwa bahwa pengaruh waktu penyimpanan terhadap kualitas genomik RNA yang terbaik pada suhu -20°C adalah metode III. Hal ini disebabkan karena koefisien regresinya hanya sebesar -0.082 dimana jika waktu penyimpanan bertambah satu bulan, maka penurunan tingkat kemurnian RNA hanya sebesar 0.082 pada setiap bulannya. Nilai koefisien regresi hasil ekstraksi dari metode iri paling rendah jika dibandingkan dengan hasil kedua jenis metode ekstraksi lainnya.

Jika dibandingkan pengaruh suhu penyimpanan yakni pada suhu -20°C dan -80°C terhadap kualitas genomik RNA, maka secara statistik berdasarkan pembahasan diatas dapat diketahui bahwa pengaruh waktu penyimpanan terhadap kualitas genomik RNA yang terbaik adalah metode ekstraksi III dari suhu penyimpanan -80°C . Hal ini disebabkan karena nilai koefisien regresinya paling rendah jika dibandingkan dengan hasil kedua jenis metode ekstraksi lainnya. Dengan demikian secara statistik dapat diketahui bahwa penggunaan metode ekstraksi III lebih baik karena menunjukkan stabilitas kemurnian RNA dari sampel yang diuji. Sedangkan suhu penyimpanan yang terbaik adalah -80°C dimana stabilitas kemurnian RNA TSV sampel yang disimpan lebih dapat dipertahankan.

Hasil Pengukuran Kuantitas Genomik RNA TSV (ng/ μl)

Brown (2003), menyatakan bahwa konsentrasi DNA atau RNA dapat diukur secara tepat dengan spektrofotometer absorben ultraviolet (*ultraviolet absorbance spectrophotometry*). Banyaknya radiasi ultraviolet yang diserap oleh larutan DNA/RNA berbanding lurus dengan banyaknya DNA/RNA sampel. Biasanya absorben diukur pada panjang gelombang 260 nm. Sulandari dan Zein (2003), menyatakan pula bahwa apabila kepadatan optic atau OD_{260} sama dengan satu, maka konsentrasinya setara dengan $50 \mu\text{g/ml}$ DNA untai ganda atau $40 \mu\text{g/ml}$ RNA.



Gambar 7. Grafik kuantitas genomik RNA dari hasil ekstraksi pada suhu -20°C (A). Grafik kuantitas genomik RNA dari hasil ekstraksi pada suhu -80°C (B).

Berdasarkan Gambar 7 diatas menunjukkan bahwa ketiga jenis metode ekstraksi mengalami penurunan tingkat kuantitas genomik RNA pada suhu -20°C (A). Metode Ekstraksi III memiliki nilai konsentrasi RNA tertinggi dan penurunan tingkat konsentrasi yang relatif lebih stabil jika dibandingkan dengan kedua jenis metode ekstraksi lainnya. Berdasarkan Gambar 7 (B) diatas, menunjukkan bahwa ketiga jenis metode ekstraksi mengalami penurunan kuantitas RNA. Tingkat penurunan konsentrasi RNA yang signifikan terdapat pada metode ekstraksi I sedangkan penurunan yang relatif stabil terdapat pada metode ekstraksi III.

Untuk mengetahui adakah pengaruh waktu penyimpanan 0, 1, 2 dan 3 bulan dengan suhu -20°C dan -80°C terhadap konsentrasi RNA yang dihasilkan oleh ketiga metode ekstraksi yakni I, II dan III maka dilakukan analisa regresi berdasarkan perhitungan dengan menggunakan program statistik ANOVA dengan rancangan acak kelompok faktorial.

Analisa Regresi untuk Pengamatan Hasil Kuantitas Genomik RNA TSV pada Suhu Penyimpanan -20°C dan -80°C

Berdasarkan Grafik 7 diatas menunjukkan bahwa bahwa pengaruh waktu penyimpanan terhadap kuantitas genomik RNA yang terbaik pada suhu -20°C adalah metode Ekstraksi III. Hal ini disebabkan karena koefisien regresinya hanya sebesar -57.987 dimana jika waktu penyimpanan bertambah satu bulan, maka penurunan tingkat kuantitas genomik RNA hanya sebesar 57.987 pada setiap bulannya. Nilai koefisien regresi hasil ekstraksi dari metode ini paling rendah jika dibandingkan dengan hasil kedua jenis metode ekstraksi lainnya.

Berdasarkan Grafik pada Gambar 7 diatas menunjukkan bahwa bahwa pengaruh waktu penyimpanan terhadap kuantitas genomik RNA yang terbaik pada suhu -80°C adalah metode Ekstraksi III. Hal ini disebabkan karena koefisien regresinya hanya sebesar -41.953 dimana jika waktu penyimpanan bertambah satu bulan, maka penurunan tingkat kemurnian RNA hanya sebesar -41.953 pada setiap bulannya. Nilai koefisien regresi hasil ekstraksi dari metode ini paling rendah jika dibandingkan dengan hasil kedua jenis metode ekstraksi lainnya.

Jika dibandingkan dengan pengaruh suhu penyimpanan terhadap kemurnian RNA pada suhu -20°C dan -80°C, maka secara statistik berdasarkan pembahasan diatas dapat diketahui bahwa pengaruh waktu penyimpanan terhadap kuantitas genomik RNA yang terbaik adalah metode Ekstraksi III dari suhu penyimpanan -80°C. Hal ini disebabkan karena nilai koefisien regresinya paling rendah jika dibandingkan dengan hasil kedua jenis metode ekstraksi lainnya. Dengan demikian penggunaan metode ekstraksi III lebih baik karena dapat mempertahankan konsentrasi RNA dari sampel yang diuji. Sedangkan suhu penyimpanan yang terbaik adalah -80°C dimana stabilitas kuantitas genomik RNA sampel yang disimpan lebih dapat dipertahankan.

Sambrook and Russel (2003), mengatakan bahwa hasil dari total RNA tergantung dari sumber jaringan atau sel berasal dan secara umum berkisar antara 4-7 µg/ml dari jaringan atau 5-10 µg/10 sel. Pengukuran kuantitas genomik RNA yang optimal harus berkisar antara 50 ng/µl – 500 ng/µl. Dalam hubungannya dengan pemeriksaan PCR, maka kuantitas genomik RNA yang besar dapat memproduksi cDNA yang lebih sedikit dalam amplifikasi PCR. Untuk kuantitas genomik RNA yang rendah akan memiliki cDNA yang lebih berkualitas. Kontaminasi DNA dan RNA tidak dapat dikenali oleh alat nanodrop spectrometer. (Wiliem. *et.al.*, 2009)

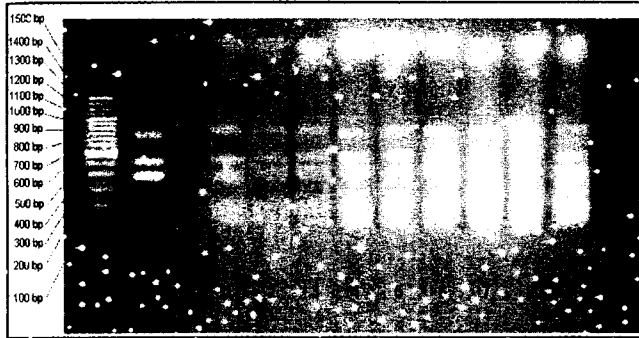
Elektroforesis TSV

Widayanti (2006), mengatakan bahwa elektroforesis adalah proses Bergeraknya molekul yang bermuatan pada suatu medan listrik. Kecepatan molekul yang bergerak pada medan listrik tergantung pada muatan, bentuk dan ukuran. Gel agarosa merupakan matriks penyangga yang banyak dipakai untuk separasi protein dan asam nukleat. Fatchiyah, 2006, mengatakan migrasi elektroforesis DNA melalui gel agarosa dipengaruhi oleh faktor ukuran dan konformasi molekul DNA, konsentrasi agarosa, arus listrik dan temperatur. Pewarnaan Ethidium Bromide (EtBr) digunakan untuk alat identifikasi dan mengukur semi-kualitatif fragmen DNA yang terseparasi dalam gel. EtBr akan terikat diantara dua untai ganda DNA sehingga pita DNA dalam gel agarosa akan berpendar oleh karena pewarna ini mengandung zat fluoresence.

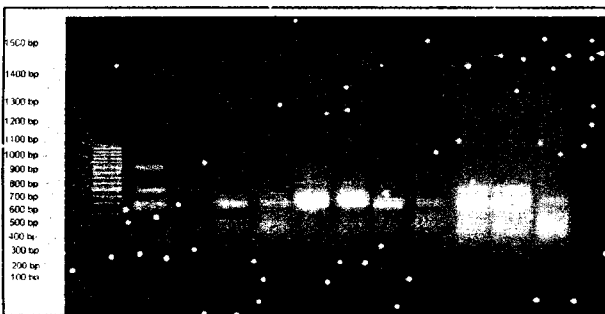
Pengamatan hasil elektroforesis PCR dari ketiga jenis metode pada perlakuan penyimpanan suhu -20°C dan -80°C selama 0, 1, 2 dan 3 bulan ditunjukkan pada Gambar 8 (a-d) dan Gambar 9 (a-d).

Pengamatan Hasil Elektroforesis PCR dari Ketiga Jenis Metode pada Suhu Penyimpanan -20°C

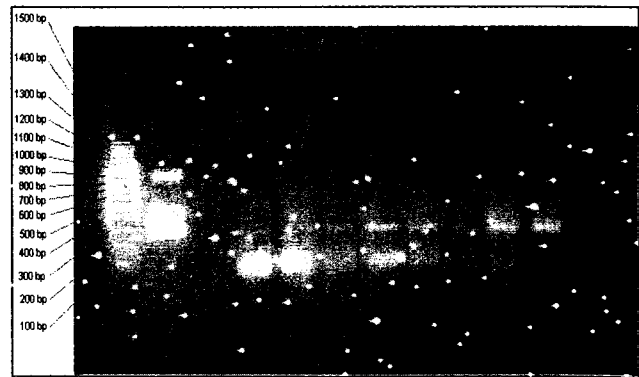
Hasil PCR pada penyimpanan sampel RNA suhu -20°C seperti pada Gambar 8 a-d.



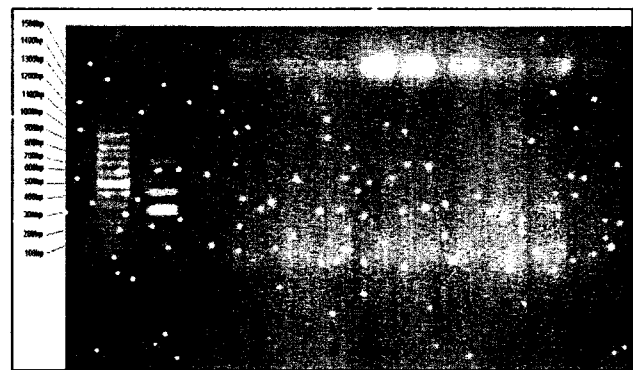
Gambar 8-a. Hasil elektroforesis PCR pada penyimpanan sampel RNA suhu -20°C bulan ke - 0. Keterangan = A) Marker DNA Lamda 100bp – 1500 bp; B) Kontrol positif berat (284 bp, 476 bp, 848 bp); C) Kontrol negatif (-); 1-3) Metode Ekstraksi I [1. TSV positif berat (284 bp, 476 bp, 848 bp), 2. TSV positif berat (284 bp, 476 bp, 848 bp), 3. TSV positif berat (284 bp, 476 bp, 848 bp)]; 4-6) Metode Ekstraksi II [4. TSV positif berat (284 bp, 476 bp, 848 bp), 5. TSV positif berat (284 bp, 476 bp, 848 bp), 6. TSV positif berat (284 bp, 476 bp, 848 bp)], 7-9) Metode Ekstraksi III [7. TSV positif berat (284 bp, 476 bp, 848 bp), 8. TSV positif berat (284 bp, 476 bp, 848 bp), 9. TSV positif berat (284 bp, 476 bp, 848 bp)].



Gambar 8-b. Hasil elektroforesis PCR pada penyimpanan sampel suhu -20°C bulan ke - 1. Keterangan = A) Marker DNA Lamda 100bp – 1500 bp; B) Kontrol positif berat (284 bp, 476 bp, 848 bp); C) Kontrol negatif (-); 1-3) Metode Ekstraksi I [1. TSV positif ringan (284 bp), 2. TSV Positif ringan (284 bp), 3. TSV positif ringan (284 bp)]; 4-6) Metode Ekstraksi II [4. TSV positif ringan (284bp), 5. TSV positif ringan (284 bp), 6. TSV positif ringan (284 bp)], 7-9) Metode Ekstraksi III [7. positif sedang (284 bp, 476 bp), 8. positif sedang (284 bp, 476 bp), 9. positif ringan (284 bp)].



Gambar 8-c. Hasil elektroforesis PCR pada penyimpanan sampel suhu ke - 20°C bulan ke - 2. Keterangan = A) Marker DNA Lamda 100bp – 1500 bp; B) Kontrol positif (284 bp, 476 bp, 848 bp); C) Kontrol negatif (-); 1-3) Metode Ekstraksi I [1. TSV positif ringan (284 bp), 2. TSV negatif (-), 3. TSV positif ringan (284 bp)]; 4-6) Metode Ekstraksi II [4. TSV positif ringan (284bp), 5. TSV positif ringan (284 bp), 6. TSV positif ringan (284 bp)], 7-9) Metode Ekstraksi III [7. TSV positif ringan (284 bp), 8. positif ringan (284 bp), 9. positif ringan (284 bp)].

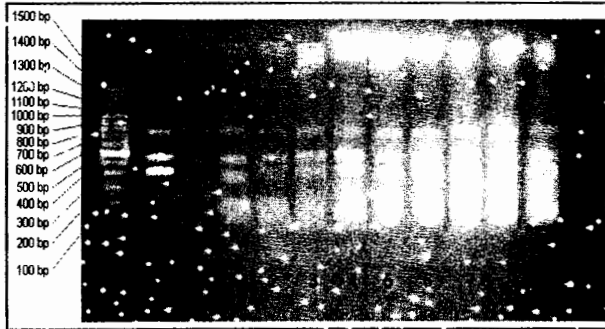


Gambar 8-d. Hasil elektroforesis PCR pada penyimpanan sampel suhu - 20°C bulan ke - 3. Keterangan : A) Marker DNA Lamda 100bp – 1500 bp; B) Kontrol positif (284 bp, 476 bp, 848 bp); C) Kontrol negatif (-); 1-3) Metode Ekstraksi I [1. TSV negatif, 2. TSV negatif, 3. TSV negatif]; 4-6) Metode Ekstraksi II [4. TSV negatif, 5. TSV negatif, 6. TSV negatif, 7-9) Metode Ekstraksi III [7. TSV positif ringan (284 bp), 8. positif ringan (284 bp), 9. TSV negatif].

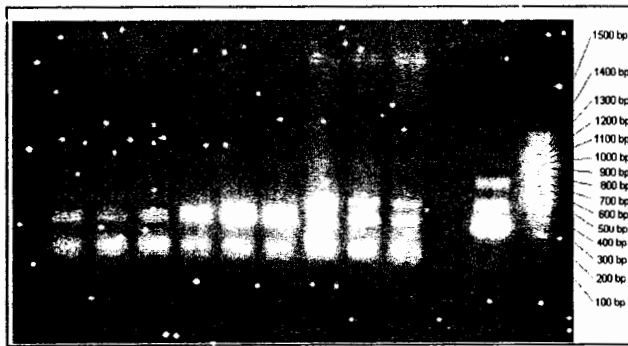
Keseluruhan hasil pengamatan kualitas RNA yang tervisualisasi pada hasil elektroforesis RT-PCR terhadap hasil ekstraksi yang disimpan pada suhu -20°C dapat diketahui bahwa metode Ekstraksi III merupakan metode ekstraksi yang terbaik karena hingga penyimpanan pada bulan ke - 3, masih menunjukkan hasil yang positif ringan sedangkan kedua metode ekstraksi lainnya seluruhnya menunjukkan hasil negatif.

Pengamatan Hasil Kuantitas Genomik RNA pada Suhu Penyimpanan -80°C

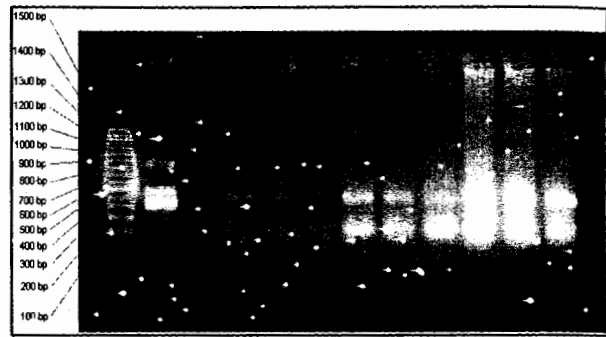
Hasil PCR pada penyimpanan sampel RNA suhu -80°C seperti pada Gambar 9 a-d.



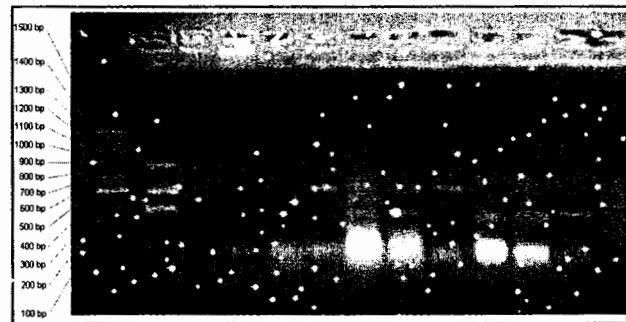
Gambar 9-a. Hasil elektroforesis PCR pada penyimpanan sampel suhu -80°C bulan ke - 0. Keterangan = A) Marker DNA Lamda 100bp – 1500 bp; B) Kontrol positif (284 bp, 476 bp, 848 bp); C) Kontrol negatif (-); 1-3) Metode Ekstraksi I [1. TSV positif (333 bp, 476 bp, 848 bp), 2. positif (284 bp, 476 bp, 848 bp), 3. positif (284 bp, 476 bp, 848 bp)]; 4-6) Metode Ekstraksi II [4. positif (284 bp, 476 bp, 848 bp), 5. positif (284 bp, 476 bp, 848 bp), 6. positif (284 bp, 476 bp, 848 bp)], 7-9) Metode Ekstraksi III [7. positif (284 bp, 476 bp, 848 bp), 8. positif (284 bp, 476 bp, 848 bp), 9. positif (284 bp, 476 bp, 848 bp)]



Gambar 9-b. Hasil elektroforesis PCR pada penyimpanan sampel suhu -80°C bulan ke - 1. Keterangan = A) Marker DNA Lamda 100bp – 1500 bp; B) Kontrol positif (284 bp, 476 bp, 848 bp); C) Kontrol negatif (-); 1-3) Metode Ekstraksi I [1. TSV positif ringan (284 bp), 2. TSV positif ringan (284 bp), 3. TSV positif ringan (284 bp)]; 4-6) Metode II [4. TSV positif ringan (284 bp), 5. TSV positif ringan (284 bp), 6. TSV positif ringan (284 bp)], 7-9) Metode Ekstraksi III [7. TSV positif sedang (284bp, 476 bp), 8. TSV positif sedang (284bp, 476 bp), 9. TSV positif sedang (284bp, 476 bp)]



Gambar 9-c. Hasil elektroforesis PCR pada penyimpanan sampel suhu -80°C bulan ke - 2. Keterangan = A) Marker DNA Lamda 100bp – 1500 bp; B) Kontrol positif (284 bp, 476 bp, 848 bp); C) Kontrol negatif (-); 1-3) Metode Ekstraksi I [1. TSV positif ringan (284 bp), 2. TSV positif ringan (284 bp), 3. TSV positif ringan (284 bp)]; 4-6) Metode Ekstraksi II [4. TSV positif ringan (284 bp), 5. TSV positif ringan (284 bp), 6. TSV positif ringan (284 bp)], 7-9) Metode Ekstraksi III [7. TSV positif ringan (284 bp), 8. TSV positif ringan (284 bp), 9. TSV positif ringan (284 bp)]



Gambar 9-d. Hasil elektroforesis PCR pada penyimpanan sampel suhu -80°C bulan ke - 3. Keterangan = A) Marker DNA Lamda 100bp – 1500 bp; B) Kontrol positif (284 bp, 476 bp, 848 bp); C) Kontrol negatif (-); 1-3) Metode Ekstraksi I [1. TSV positif ringan (284 bp), 2. TSV positif ringan (284 bp), 3. TSV negatif (680 bp)]; 4-6) Metode Ekstraksi II [4. TSV positif ringan (284 bp), 5. TSV positif ringan (284 bp), 6. TSV negatif (680 bp)], 7-9) Metode Ekstraksi III [7. TSV positif ringan (284 bp), 8. TSV positif ringan (284 bp), 9. TSV positif ringan (284 bp)]

Keseluruhan hasil pengamatan kualitas RNA yang tervisualisasi pada hasil elektroforesis RT-PCR terhadap hasil ekstraksi yang disimpan pada suhu -80°C dapat diketahui bahwa metode Ekstraksi III merupakan metode ekstraksi yang terbaik karena hingga penyimpanan pada bulan ke-3, seluruh sampel masih menunjukkan hasil

yang positif ringan sedangkan kedua metode ekstraksi lainnya masing-masing sudah ada yang menunjukkan hasil negatif.

TSV memiliki genom +ssRNA dengan panjang 9 kb. Disain primer dalam kits yang digunakan pada penelitian ini mengenali hingga 848 bp. Sampel yang diduga terinfeksi TSV positif ringan ditandai dengan munculnya band pada 276 bp, sampel yang terinfeksi TSV positif sedang ditandai dengan munculnya band pada 276 bp dan 476 bp sedangkan sampel yang terinfeksi TSV positif berat ditandai dengan munculnya band pada 276 bp, 476 bp dan 848 bp. Hal ini menunjukkan bahwa batasan sekuen TSV yang dikenali oleh primer adalah 848 bp. Band pada 476 bp dan 276 bp yang tervisualisasi menunjukkan sekuen tersebut berada didalam sekuen 848 bp. Hasil negatif atau tidak terinfeksi TSV ditunjukkan pada 680 bp yang merupakan band pengkode β -actin (sitosekeleton).

Pengaruh Suhu dan Waktu Penyimpanan terhadap Kualitas Genomik, Kuantitas Genomik serta Kualitas Elektroforesis RNA TSV

Salah satu sifat RNA adalah mudah sekali mengalami degradasi yang dapat disebabkan oleh beberapa hal seperti handling yang kurang cepat serta suhu penyimpanan yang kurang optimal. Suhu penyimpanan yang rendah berperan dalam menjaga kualitas maupun kuantitas sample RNA yang disimpan.

Chornczynski (1992), mengatakan bahwa penyimpanan sampel RNA setelah presipitasi dapat dilakukan dalam formamide pada suhu -20°C tanpa degradasi setidaknya dapat bertahan

selama 1 tahun. Formamide secara kimiawi akan menjadikan kondisi yang stabil dan melindungi adanya degradasi RNA dari RNase

Penyimpanan sampel RNA dapat pula dilakukan dengan menggunakan RNase-free H₂O (dengan 0,1 mM EDTA) atau TE buffer (10 mM Tris, 1mM EDTA). Larutan EDTA berfungsi untuk menciptakan RNase-free. Penggunaan larutan EDTA yang sudah lama dapat menimbulkan pertumbuhan mikrobia dan dapat mengkontaminasi sampel RNA dengan nuclease.

Berdasarkan pengamatan terhadap pengukuran kemurnian, konsentrasi dan kualitas elektroforesis RNA serta analisa regresi melalui program ANOVA dalam penelitian ini, seluruhnya menunjukkan adanya tingkat penurunan dengan perbedaan antara perlakuan pada suhu penyimpanan -20°C dan -80°C. Hal ini menunjukkan bahwa RNA TSV dalam penelitian ini telah mengalami degradasi pada setiap bulannya dan hal ini mungkin disebabkan oleh karena perakuan penyimpanan sampel yang tidak dilengkapi dengan penambahan senyawa lain seperti formamide, RNase-free H₂O (dengan 0,1 mM EDTA) atau TE buffer melainkan hanya perlakuan dengan suhu penyimpanan yang berbeda.

Tabel 1. Hasil Rerata Pengukuran Kuantitas Genomik Hasil Ekstraksi RNA TSV

PENGUKURAN RNA	JENIS EKSTRAKSI	SUHU PENYIMPANAN				SUHU PENYIMPANAN			
		- 20 °C				- 80 °C			
		Waktu Penyimpanan (Bulan)				Waktu Penyimpanan (Bulan)			
		0	1	2	3	0	1	2	3
Kualitas genomik RNA	Metode Ekstraksi I	2.58	2.24	2.06	1.51	2.58	2.44	1.88	1.71
	Metode Ekstraksi II	2.19	2.12	1.96	1.67	2.19	2.24	2.00	1.76
	Metode Ekstraksi III	2.08	1.96	1.93	1.81	2.08	1.93	1.89	1.83
Kuantitas genomik RNA	Metode Ekstraksi I	399.86	310.37	205.27	112.62	399.86	344.93	228.83	158.12
	Metode Ekstraksi II	326.96	223.29	204.82	135.88	326.96	263.51	222.84	170.10
	Metode Ekstraksi III	441.30	376.75	358.04	254.25	441.30	354.21	347.37	303.74

Namun demikian, hasil pengukuran keseluruhan pada suhu -80°C relatif lebih baik jika dibandingkan pada suhu penyimpanan -20°C

sehingga dapat dikatakan bahwa pada penyimpanan sampel dengan suhu yang lebih rendah akan lebih dapat mempertahankan

kuantitas genomik RNA TSV yang disimpan seperti ditunjukkan pada Tabel 1.

Berdasarkan dari hasil keseluruhan data yang diperoleh dapat ditarik kesimpulan bahwa dalam mendeteksi penyakit TSV pada udang vannamei yang terbaik menggunakan metode ekstraksi III (*phenol - chloroform*), sedangkan waktu dan suhu penyimpanan genom RNA yang

dianjurkan adalah dengan waktu penyimpanan maksimal tiga bulan dan pada suhu -80 °C.

Ucapan Terima Kasih

Tidak lupa kami ucapkan terimakasih kepada bapak Dr. MB. Malole yang telah membimbing kami dalam melakukan studi ini.

Daftar Pustaka

- Anonymous. 2004. *Usaha Pertambakan Udang Vannamei Prospektif. Bisnis Indonesia*. Jakarta. 195 p.
- Brown, TA. 2003. Pengantar Kloning Gena, Yayasan Essentia Medica, Yogyakarta, 274 hal
- Chornczynski, P. 1992. Solubilization in formamide protects RNA from degradation. *Nuc. Acids Res.* 20:3791-3792.
- Fatchiyah. 2006. *Polymerase Chain Reaction (Dasar Teknik Amplifikasi DNA dan Aplikasinya)*. Laboratorium Sentral
- Biologi Molekular dan Seluler. Universitas Brawijaya. Malang.
- Koesharyani, D.R., K. Mahardika, F. Johnny, Zafran, and K. Yuasa. 2001. Manual for Fish Disease Diagnosis-II. Marine Fish and Crustacean Disease in Indonesia.
- Lightner, DV. 1995. Taura Syndrome: An Economically Important Viral Disease Impacting The Shrimp Farming Industries Of The Americas Including The United States. In: Proceedings Of The Nine-ninth Annual Meeting, Reno, Nevada. Pat Campbell & Associates, Richmond, Virginia, USA. Pp. 36-52.
- Lightner, DV, Nunan LM, Poulos, BT. 1998. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura Syndrome Virus (TSV) in experimentally infected shrimp. *Disease of aquatic organisms*. Vol.34. hlm 87-91.
- Sambrook J, Russel DW. 2003. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.. Chapter 8: In vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction.
- Sulandari, S, Zein, M. 2003. *Panduan Praktis Laboratorium DNA*. Bidang Zoologi. Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong.
- Widayanti. 2005. Deteksi Penyakit Taura Syndrome Virus Pada Udang Putih (*Penaeus vannamei*) dengan Metode Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction. *Perikanan*. Vol. VII/I, pp. 40-46
- Williem, VW, Rosenbaum H, Weiner DB, 2009, Effect of RNA Concentration on cDNA Synthesis For cDNA Amplification, *Genome Research*, 19: 2: 86-88, Downloaded from genome.cshlp.org on March 23, 2009 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press.